

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-194035

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)8月28日

A 61 K 39/395

8214-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 γ -グロブリン製剤

⑰ 特 願 昭60-104679

⑱ 出 願 昭60(1985)2月21日

⑲ 特 願 昭60-33335の分割

⑲ 発 明 者 平 尾 豊 豊中市寺内2-14-1606号

⑲ 発 明 者 瓜 生 勝 寛 桜井市大福中津道3丁目601-32

⑲ 発 明 者 上 村 八 尋 枚方市三矢町5-18 メゾン枚方215

⑲ 出 願 人 株式会社 ミドリ十字 大阪市東区今橋1丁目15番地の1

⑲ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

 γ -グロブリン製剤

2. 特許請求の範囲

(1) 加熱処理されてなる γ -グロブリン製剤。

(2) 安定化剤の存在下に加熱処理することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

(3) 安定化剤が単糖類、二糖類、糖アルコールから選ばれた少なくとも一種である特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

(4) 加熱処理が、60℃、10時間処理である特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

(5) 上記安定化剤に加えて、中性アミノ酸、中性塩、炭素原子数3～10の有機カルボン酸塩、界面活性剤より選ばれた少なくとも一種の補助安定化剤を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、加熱処理してなる γ -グロブリン製

剤に関する。

更に詳しくは、 γ -グロブリンに、所望により安定化剤を添加し、低温殺菌(60℃、10時間)した場合、重合体の増加、抗補体価の上昇を認めない安定な γ -グロブリン製剤に関する。

(従来の技術)

血漿蛋白成分である免疫グロブリンの内、特にIgGを主成分とする γ -グロブリン製剤は、これまで広く各種感染症の予防並びに治療に役立てられてきたが、熱安定性に欠けること、多種ウィルス、細菌等の抗体を広く含有している等の理由で濾過による除菌方法がとられている。しかし、 γ -グロブリンを血漿蛋白の分画から得る場合には、肝炎ウィルスやエイズウィルス等の極微小サイズの夾雑ウィルスはフィルター孔を通過することが可能であり、得た γ -グロブリン中に混在することは100%否定することはできない。

一方、血漿蛋白成分であるワクチンでは、安定剤の存在下に60℃ないし120℃に加熱する方法がすでに使用されており、成果をあげている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明の目的は、夾雑を危惧されるウィルスの不活化された γ -グロブリン製剤を提供することである。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、種々検討を重ね、 γ -グロブリン、好ましくはその水溶液に対して、夾雑ウィルスの不活化方法として、60で、10時間の加熱処理を施すことが非常に優れた夾雑ウィルス不活化方法であり、さらに、単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる少なくとも一種を添加すれば加熱処理に対する γ -グロブリンの熱安定性が著しく高まることを見出すと共に上記安定化剤に加えてさらに中性アミノ酸、中性塩、界面活性剤、有機カルボン酸塩から選ばれる少なくとも一種を共存させることによって γ -グロブリンの熱安定性がより一層高められることを見出し、本発明を完成した。

また、本発明の製剤では加熱処理することにより γ -グロブリンを単量体に解離した状態で得る

ものではない。当該安定化剤の添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり10～100gである。

本発明で使用される補助安定化剤に関して、中性塩としては塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属のハロゲン酸塩などが例示され、添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり0.1～10gである。

中性アミノ酸（即ち、モノアミノモノカルボン酸）としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどが例示され、添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり1～20gである。

有機カルボン酸としては、炭化水素残基にカルボキシル基が置換したものをいい、炭化水素残基は飽和されていても不飽和であってもよく、また鎖状（直鎖状または分枝状）、環状のいずれでもよい。当該炭化水素残基としてはアルキル基、アリール基（たとえばフェニル基）などが例示され

こともできる。

即ち、本発明は、加熱処理されてなる γ -グロブリン製剤に関する。

本発明においては、 γ -グロブリン含有水溶液の状態で加熱処理に付すことが好ましい。 γ -グロブリン含有水溶液としては、 γ -グロブリンを含む未精製な水溶液から精製された水溶液までいかなる段階の γ -グロブリン水溶液であってもよいが、有利には部分精製または精製段階の水溶液が加熱処理の対象とされる。その蛋白質（ γ -グロブリン）の含量は0.1～30%（w/v）のものが好ましい。また、当該水溶液のpHは一般にpH4.5～10であり、好ましくは適当な緩衝液によってpH6～8に調整されることが好ましい。

γ -グロブリン含有水溶液に加えらるる安定化剤に関して、単糖類としてはグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等が、二糖類としてはショ糖、麦芽糖、乳糖等が、糖アルコールとしてはマンニット、ソルビット、キシリット等が好適なものとして例示されるが、これらに限定される

る。当該有機カルボン酸におけるカルボキシル基は複数個であってもよいが、1および2個が好ましい。また当該有機カルボン酸は、水酸基で置換されていてもよい。有機カルボン酸塩における塩としては、生理的に許容されるものであれば特に制限はなく、好ましいものとしては、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩など）、特に好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩があげられる。

有機カルボン酸塩の具体例としては、プロパン酸、ブタン酸、ペンタン酸、カブリン酸、カプロン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、クエン酸、マンデル酸などの生理的に許容される塩、特にアルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩）があげられる。

かかる有機酸の好ましい炭素数は、3～15程度である。

有機カルボン酸塩の添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり1～30gである。

界面活性剤としては、アルキルフェニルポリオ

キシエチレン(例えばトリトン登録商標(Triton®)及びノニデット登録商標(Nonidet®))のような非イオン性剤、胆汁酸塩(例えばナトリウムタウロコラート)のようなアニオン性剤、又ベンズアルコニウムクロライドのようなカチオン性剤、プロビレンオキシドの高分子量共重合体のような界面活性を持つ多価アルコール(プルロニック登録商標(Pluronic®)F68)などが例示され、その添加量は、 γ -グロブリン水溶液100ml当たり0.002~0.05g程度が好ましい。

加熱処理は、夾雑ウィルスを不活化するに十分な温度および時間行えばよく、たとえば50℃~130℃、好ましくは約60℃にて25分~20時間、好ましくは10時間行われる。

本発明の加熱効果を検討するため、 γ -グロブリン製剤に含まれる可能性が危惧される各種ウィルスの感染性について、加熱効果を実験した。この実験は、 γ -グロブリン試料に痘瘡ウィルス、おたふくかぜウィルス、はしかウィルス、水泡性口内炎ウィルス、チタングニアウィルス、ポリオ

ものではないが、特に望ましくは、30℃以下に保存することであるが、また、これは所望により凍結乾燥製剤としてもよい。

当該処理を経た γ -グロブリンは、そのまま、または自体公知の製剤化処理を行って、例えば注射用蒸留水で希釈又は溶解して投与される。投与量は、通常、成人に対しては1回に γ -グロブリンとして、500~3000mg量、小児に対しては、1回に γ -グロブリンとして、250~1500mg量が使用される。

試験方法：

外観性状としては、濁りが問題となることから0.0...nmの吸光度を測定した。

重合体の定量は高速液体クロマトグラフィーで分析した。

抗補体価の測定は、カバットとマイヤーの方法〔実験的免疫化学(Experimental Immunology), 225, (1961)〕及び西岡、岡田の方法(免疫の生化学, 103, 昭46(共立出版))の方法に準じた。すなわち、100単位

ウィルス、コクサツキウィルス、エコーウィルスを加え、60℃で10時間の加熱処理を行い、経時的に残存するウィルス感染性を測定したが、10時間後には安定化剤の添加、不添加に係わらず、感染性を完全に失っていた。この結果は用いたウィルス以外のウィルスについても本発明の加熱処理が施されるならば感染性は失活させうることを示唆するものである。

本発明は上記加熱処理を行った後、外観、性状はもとより、重合体の定量、抗補体価の測定、麻疹抗体価の測定および急性毒性実験を行い、 γ -グロブリン製剤として医療上極めて安全性の高いまた、有効性の高いものといえる。

かくして得られた製剤は、一般に溶液状であり、高度精製 γ -グロブリンを出発材料とした場合はそのまま、粗製品を用いた場合は公知の精製法に準じて処理を行った後、必要ならば、透析、除菌濾過を行った後、包装単位に従って500~10,000mgの γ -グロブリンを含むように分注される。貯蔵方法としては、高温を避ければ特に限定される

の補体が試料を加えることによって何単位に減少するかを測定し、その減少単位を抗補体価として表わした。

麻疹抗体価はヘマグルチネーションインヒビションテスト(Hemagglutination Inhibition test)法により測定し、国際単位(IU/150mg)で表わした。

実施例1

本発明による安定化効果を確認するための実験を行った。実験には重合体を約30%含む γ -グロブリンを5%濃度に調整して行った。各種安定化剤を添加後(添加量は表中に明記)、60℃、10時間の加熱処理を行い、溶液の濁り(0.0...nm)、重合体の定量および抗補体価を調べた。この結果、安定化剤を添加することによって γ -グロブリンの加熱安定性は増大した(表1)。

また、重合体特に2量体の低下が確認された。

実施例2

重合体を約20%含む γ -グロブリン溶液に各種濃度にグルコースを添加、 γ -グロブリン濃度

を5%に調整したものにつき60℃で加熱処理を行い、経時的にO.D.値、重合体定量、抗補体価、麻疹抗体価等の測定を行った。

グルコースを加えた系では、加えた量が増すに伴いγ-グロブリンの安定性が高まった。100gグルコース添加の系では60℃、10時間加熱においても全く白濁せず、麻疹抗体価の減少も見られなかった。しかもダイマーもわずか10%に低下し、抗補体価も19単位と低下した(表2)。

実施例3

安定化剤であるグルコースに補助安定化剤である中性アミノ酸(グリシン)、中性塩(塩化ナトリウム)、有機カルボン酸塩(クエン酸ナトリウム)、界面活性剤(ブルロニック®F68)等を加え、60℃で加熱処理におけるγ-グロブリンの安定性につき調べた。実施例1と同様重合体を約15%含むγ-グロブリン溶液で行った。

グルコース添加量をγ-グロブリン水溶液100ml当たり75gとし、塩化ナトリウム5.8%添加、グリシン5%添加、クエン酸ナトリウム10%添

加、ブルロニックF68 0.01%添加および塩化ナトリウム5.8%とブルロニックF68 0.01%両補助安定化剤添加の各系について60℃で加熱処理を施した。結果は表3に示す。補助安定化剤を添加することによって重合体および抗補体価をさらに低下させることができた。

実施例4

安全性試験として急性毒性実験を行った。

実施例3で60℃、10時間加熱処理を施したサンプルA、B、C、D、E、Fにつき無菌生理的食塩水で十分透析した後、マウスの尾静脈から1匹当たり総量0.5mlおよび1.0mlをそれぞれ1群5匹に投与し、7日間観察したが、異常は認められなかった。

(以下余白)

表1

安定化剤	添加量 ^{※1}	O.D.値 ^{※2}	重合体(%)		抗補体価(単位)
			ダイマー	ポリマー	
コントロール	(加熱前)	0.024	33	2	54
グルコース	50	0.010	15	2	38
シロ糖	50	0.012	13	2	36
マンニット	20	0.017	17	2	42

※1: γ-グロブリンの5w/v%溶液100ml当たりの添加量(g)
※2: 測定不可能

表2 (60℃、10時間加熱処理)

グルコース添加量(g)	O.D.値 ^{※2}	重合体(%)		抗補体価(単位)	麻疹抗体価(1U)
		ダイマー	ポリマー		
コントロール(加熱前)	0.024	22	3	54	42
25	0.040	15	30	>50	<10.5
50	0.010	13	3	36	21
75	0.004	12	2	28	40
100	0.004	10	2	19	40

※2: 測定不可能

表3

補助安定化剤	添加量(g)	O.D.値 ^{※2}	重合体(%)		抗補体価(単位)	麻疹抗体価(1U)
			ダイマー	ポリマー		
コントロール	(加熱前)	0.004	15	2	44	42
無添加		0.004	8	1	28	40
塩化ナトリウム	5.8	0.004	5	1	18	42
グリシン	5	0.006	8	2	25	45
クエン酸ナトリウム	10	0.004	8	1	24	38
ブルロニックF68	0.01	0.004	6	1	13	40
塩化ナトリウム ブルロニックF68	5.8 0.01	0.004	6	1	12	41

手 続 補 正 書 (自発)

昭和60年8月 1 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第104679号

2. 発明の名称

γ-グロブリン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

代表者 松 下 康 蔵

4. 代 理 人 〇541

住所 大阪市東区平野町4丁目53番地-3

ニューライフ平野町406号

電話 (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士 (8079) 高 島

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第9頁、第9行の「500~3000」を

「2500~5000」に訂正する。

(2) 同書第9頁、第9行の「250~1500mg量」

を「100~150 mg/kg体重」に訂正する。

(3) 同書第12頁、第1行の「ブルロニックF68」

を「ブルロニック・F68」に訂正する。

(4) 同書第12頁、第2行の「ブルロニックF68」

を「ブルロニック・F68」に訂正する。

(5) 同書第13~14頁、表3の

ブルロニックF68
塩化ナトリウム ブルロニックF68

を

ブルロニック・F68
塩化ナトリウム ブルロニック・F68

に訂正する。

以上